

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16774

研究課題名(和文)腎癌の脂肪酸伸長酵素ELOVL2による脂質の質的変容を介した悪性化機序の解明

研究課題名(英文)The roles of ELOVL2 in the progression of renal cell carcinoma

研究代表者

神鳥 周也(Kandori, Shuya)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50707825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪酸伸長酵素であるELOVLs(Elongation of very-long-chain fatty acids)は脂肪酸の伸長反応により極長鎖脂肪酸を合成する酵素であり、正常臓器における生理機能の重要な役割を果たしている。淡明型腎細胞癌は細胞内の脂質量が豊富であることが特徴であるが、ELOVLsの役割については未だ検討はなされていない。本研究により、淡明型腎細胞癌ではELOVL2の発現が亢進し、アポトーシスを抑制することで細胞増殖を促進することが明らかとなった。さらにELOVL2高発現症例の予後が不良であり、脂質代謝を介したがんの進展メカニズムにおける新たな知見であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌と脂質代謝との関連については、新規の脂肪酸合成(脂質の「量」)が癌では亢進していることは数多く報告されている一方で、脂質の「質」と癌との関係は未だ十分に解明されていない。特に、本研究で着目したELOVLsに関する研究は腎癌のみならず他癌種でも未だ報告が非常に少なく、学術的独創性が高いと考えられる。また、脂肪酸はエネルギー源のみならず、生体膜成分やシグナル分子として多彩な生理機能を有しており、本研究を通して腎癌の悪性化における脂質代謝の分子機構が明らかになると期待される。また、ELOVL2による脂質の「質」の変化と腎癌の悪性化との関連が明らかになれば、新規治療開発の一助になる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Elongation of very-long-chain fatty acids (ELOVLs) catalyzes the elongation of very long-chain fatty acids and is required for various functions of normal organs by changing fatty acid composition of lipids. A hallmark of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the presence of intracellular lipid droplets. However, the roles of ELOVLs remain unexplored in ccRCC. We analyzed the expression of ELOVL 1-7 in tissues of tumor and non-tumor. ELOVL2 was especially highly expressed in the tissues of ccRCC. ELOVL2 knockout suppressed cell proliferation in renal cancer cells in vitro and tumor growth in mouse xenograft model. We demonstrated that ELOVL2 promoted cell proliferation through the suppression of apoptosis. Moreover, the high expression of ELOVL2 was significantly associated with a poorer prognosis in patients with ccRCC. These results give new insights on mechanism of tumor progression through lipid metabolism.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎癌 脂質代謝 脂肪酸伸長酵素 ELOVL2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

淡明型腎細胞癌は腎癌の約 80% を占める最も発生頻度の高い組織型であり、その細胞内は脂質とグリコーゲンが豊富なために細胞質が淡明であることが特徴である。細胞内の脂質は主に中性脂肪やエステル型コレステロールであり、これら脂質がリン脂質一重層で覆われた構造である脂肪滴を形成して貯蔵されている。その一方で、腎癌の高悪性度腫瘍では細胞内脂質量が減少する(Pathology. 2010;42:374-83.)。この淡明型腎細胞癌の悪性化に伴う脂質の「量」の減少は、エネルギー代謝の観点から考えると癌の生存において不利益と考えられる。脂質の主成分である脂肪酸は、鎖長、不飽和度、各脂肪酸のバランスにより脂質の「質」が変化し、その質により生理的活性が変化する事が知られている。本研究で着目した脂肪酸伸長酵素 ELOVL (elongation of very long chain fatty acid) は脂肪酸の炭素鎖の伸長反応により極長鎖脂肪酸を合成する酵素であり、7 種のアイソザイムが存在する。

我々はまず、腎癌において発現変化する ELOVL アイソザイムを特定する為、腎癌 10 症例における非癌部と癌部の ELOVL1-7 mRNA 発現を検討し、腎癌では ELOVL2 の発現が著明に亢進していることを新たに見出した。一方、公開データベース Oncomine では、腎癌の高悪性度、有転移症例では ELOVL2 の発現が低下する傾向を認めた。

ELOVL2 の生理機能に関しては、脂肪細胞や脂肪肝マウスモデルにおいてドコサヘキサエン酸 (DHA) を増加させ、脂肪滴の形成を促進する(FEBS Lett. 2007;581:3157、J Lipid Res. 2014;55:718)。また、ELOVL2 はアラキドン酸をドキサペンタエン酸に代謝するため、ELOVL2 の発現低下によりアラキドン酸の合成が促進することが考えられる。腎癌では、アラキドン酸カスケードの抑制が治療標的になりうること (Onco Targets Ther. 2008;1:41) や血中 DHA 低値の腎癌症例では予後が不良であること (Mol Clin Oncol. 2016;5:69) が報告されている。以上から、脂肪酸伸長酵素 ELOVL2 の発現低下は脂質の「質」(脂肪酸組成) の変化を介し、細胞内脂質量と細胞増殖を制御し、腎癌の悪性化に関与するという仮説に至った。

2. 研究の目的

腎癌の約 80% を占める組織型である淡明型腎細胞癌は、細胞内に脂質とグリコーゲンを多量に含み、その細胞質が淡明であることが特徴である。しかしながら、脂質が蓄積する機序やその生物学的な意義については不明な点が多い。ELOVL は脂肪酸の伸長反応により脂質の「質」を変化させ、生理的活性に影響を及ぼす。我々は、脂肪酸伸長酵素のうち ELOVL2 の発現が腎癌において特異的に亢進することを見出した。そこで本研究では ELOVL2 による脂質の「質」の変化が、腎癌の悪性化にもたらす影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腎癌組織における脂肪酸伸長酵素 ELOVL2 の発現解析

腎癌組織における ELOVL2 の発現解析を行い、臨床的意義を明らかにする。

(2) 腎癌細胞株における ELOVL2 発現抑制が脂質代謝に及ぼす影響の検討

ELOVL2 発現抑制による脂肪酸組成に及ぼす影響を明らかにする。

(3) 腎癌細胞株における ELOVL2 発現抑制が細胞増殖に及ぼす影響とその制御機構の解明

ELOVL2 発現抑制による増殖能への影響を *in vitro*、*in vivo* で明らかにし、脂肪酸組成の変化が細胞増殖関連遺伝子発現に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 腎癌組織における ELOVL 発現と予後の関連

淡明型腎細胞癌 46 症例の凍結組織を用い、qRT-PCR により癌部と非癌部における ELOVL アイソザイム 1-7 の発現を検討した。淡明型腎細胞癌組織における ELOVL1-7 の発現量は、非癌部に比べ癌部で ELOVL1、ELOVL2、ELOVL5、ELOVL7 の発現が亢進しており、特に ELOVL2 が著明に亢進していた (図 1)。

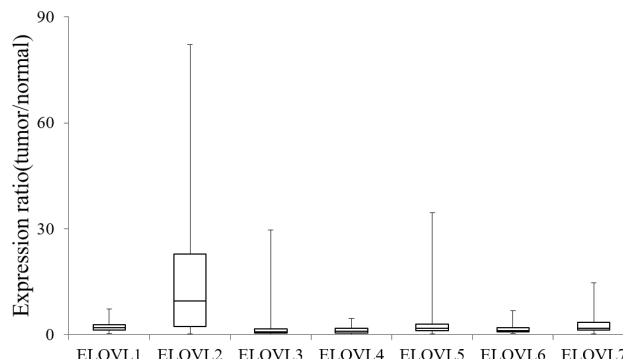


図 1 淡明型腎細胞癌における ELOVL 1-7 の発現

さらに、ELOVL2 高発現群で全生存率が有意に低く、TCGA データベースを用いた解析でも同様の結果であった (図 2)。

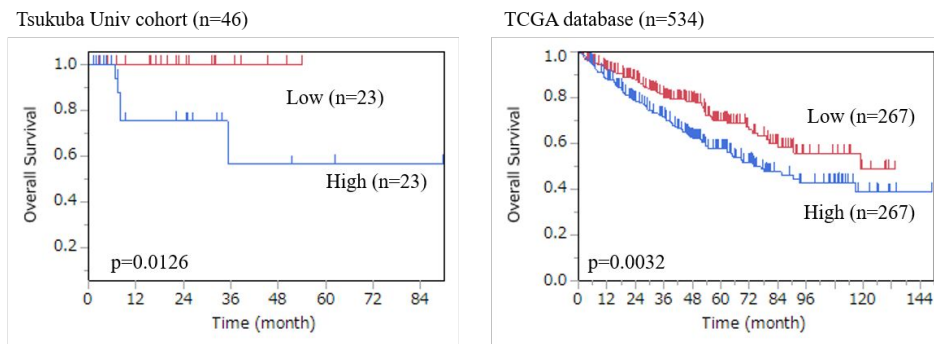


図 2 淡明型腎細胞癌におけるELOVL2発現と予後

(2) 腎癌細胞株における ELOVL2 発現抑制による細胞増殖への影響

6 つの腎癌細胞株 (ACHN、SN12c、786-O、SKRC52、Caki-1、OSRC2) における ELOVL2 の発現量を qRT-PCR により検討した。正常近位尿細管細胞株 (RPTEC) と比較して ACHN、SN12c、786-O、SKRC52 は発現が亢進していた。そこで、ELOVL2 高発現腎癌細胞株 (ACHN、SN12c、786-O、SKRC52) に対して ELOVL2 発現抑制を行い、MTT アッセイにより細胞増殖能に及ぼす影響を評価した (図 3)。その結果、ELOVL2 が細胞増殖を促進することが明らかとなった。

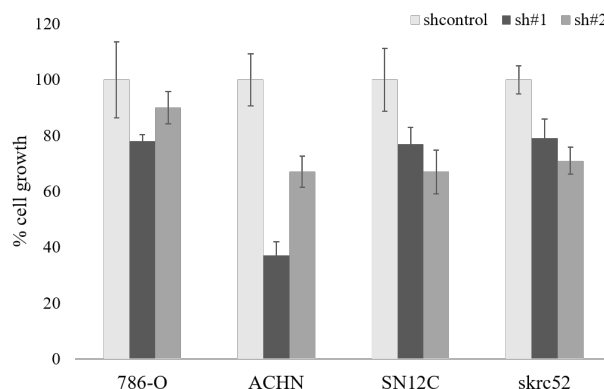


図 3 ELOVL2発現抑制による細胞増殖へ及ぼす影響

(3) 腎癌細胞株における ELOVL2 発現抑制による脂肪酸組成への影響

GC-MS を用いて、ELOVL2 高発現腎癌細胞株における脂肪酸測定を行った結果、極長鎖脂肪酸が検出感度以下であった。今後は、特定の脂質を抽出して LC-MS を用いて、脂肪酸測定を実施する予定である。

(4) 腎癌細胞株における ELOVL2 を介した細胞増殖メカニズムの解明

CRISPR-Cas9 システムを使用して ELOVL2 ノックアウト腎癌細胞株 (ACHN ELOVL2-KO 細胞) を樹立した。ACHN ELOVL2-KO 細胞においても、MTT アッセイにより細胞増殖が有意に抑制されることを再確認した (図 4)。Caspase 3/7 アッセイおよび JC-1 アッセイを行ったところ、ACHN ELOVL2-KO 細胞はアポトーシスが有意に亢進していた (図 4)。

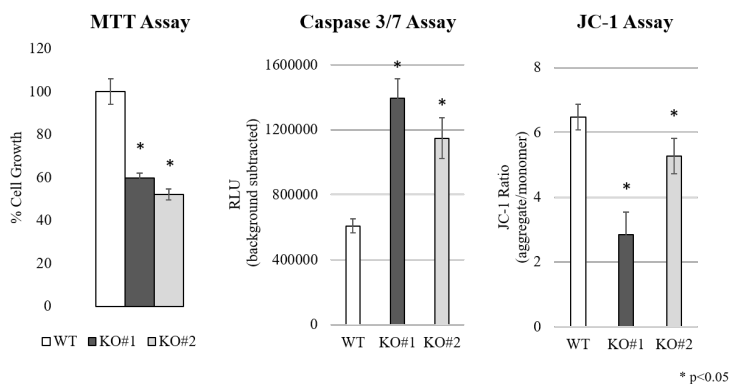


図 4 ELOVL2ノックアウト腎癌細胞株を用いた機能解析

さらに ELOVL2 ノックアウトにより GRP78、CHOP、GADD34、sXBP-1 の発現が亢進することが確認された (図5)。以上の結果から、ELOVL2 は小胞体ストレスによるアポトーシスを抑制し、腎癌の進展に寄与する可能性が示唆された。現在、RNA シークエンスにより ELOVL2 ノックアウトによる遺伝子発現変化を網羅的に解析しているところである。

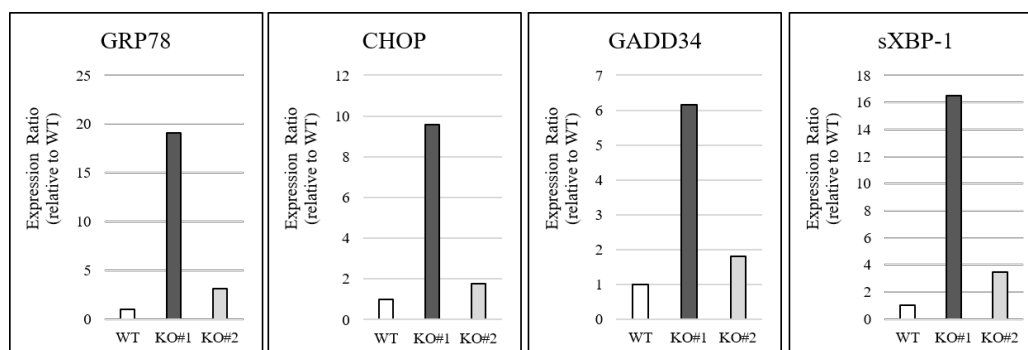


図5 ELOVL2ノックアウトによる小胞体ストレス関連遺伝子の発現変化

<引用文献>

- Kobayashi T, Zdravcevic D, Jacobsson A. ELOVL2 overexpression enhances triacylglycerol synthesis in 3T3-L1 and F442A cells. *FEBS Lett.* 2007 ; 581: 3157-63.
- Pauter AM, Olsson P, Asadi A, Herslöf B, Csikasz RI, Zdravcevic D, Jacobsson A. *J Lipid Res.* 2014 ; 55: 718-28.
- Matsuyama M, Yoshimura R. Relationship between arachidonic acid pathway and human renal cell carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2008; 1: 41-8.
- Tasaki S, Horiguchi A, Asano T, Kuroda K, Sato A, Asakuma J, Ito K, Asano T, Asakura H. Preoperative serum docosahexanoic acid level predicts prognosis of renal cell carcinoma. *Mol Clin Oncol.* 2016; 5: 69-73.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

- Shimazui T, Yoshikawa K, Ishitsuka R, Kojima T, Kandori S, Yoshino T, Miyazaki J, Uchida K, Nishiyama H. Systemic transduction of p16^{INK4a} antitumor peptide inhibits lung metastasis of the MBT-2 bladder tumor cell line in mice. *Oncol Lett.* 2019; 17(1): 1203-1210. 査読有
DOI: 10.3892/ol.2018.9655.
- Yoshino T, Miyazaki J, Kojima T, Kandori S, Shiga M, Kawahara T, Kimura T, Naka T, Kiyohara H, Watanabe M, Yamasaki S, Akaza H, Yano I, Nishiyama H. Cationized liposomal keto-mycolic acids isolated from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induce antitumor immunity in a syngeneic murine bladder cancer model. *PLoS One.* 2019; 14(1): e0209196. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0209196.
- Kandori S, Kojima T, Matsuoka T, Yoshino T, Sugiyama A, Nakamura E, Shimazui T, Funakoshi Y, Kanaho Y, Nishiyama H. Phospholipase D2 promotes disease progression of renal cell carcinoma through the induction of angiogenin. *Cancer Sci.* 2018; 109(6): 1865-1875. 査読有
DOI: 10.1111/cas.13609.
- Fujita T, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Liu Y, Itoh K, Sakurai T, Kojima T, Kandori S, Nishiyama H, Fukumoto M, Fukumoto M, Shibasaki K, Fujita J. TRPV4-dependent induction of a novel mammalian cold-inducible protein SRSF5 as well as CIRP and RBM3. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 2295. 査読有
DOI: 10.1038/s41598-017-02473-x.

[学会発表](計5件)

- Nagumo Y, Kandori S, Kimura T, Kawahara T, Kojima T, Kawai K, Ishikawa H, Nishiyama H. The impact of histologic variants of urothelial carcinoma on clinical outcomes following trimodal bladder-preserving therapy. *ASCO-the 2019 Genitourinary Cancers Symposium.* 2019
- 神鳥周也 他、本邦における陰茎癌の特徴 院内がん登録を用いた解析、第56回日本癌治療学会学術集会、2018
- 神鳥周也 他、ホスホリパーゼD2の発現亢進は腎癌の進展に関与する、第76回日本癌学会総会、2017

〔図書〕(計1件)

神鳥周也 他、エヌ・ティー・エス、プレジジョン・メディシン：ビッグデータの構築・分析から臨床応用・課題まで、2018、406

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：島野 仁

ローマ字氏名：Hitoshi Shimano

研究協力者氏名：松坂賢

ローマ字氏名：Takashi Matsuzaka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。